

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

مرکز تحقیقات داروهای گیاهی و سنتی

پایان نامه دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثرات آنتی باکتریال فراکسیون های مختلف بنه زعفران
(*Crocus sativus* L.): تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و بیواتوگرافی

توسط:

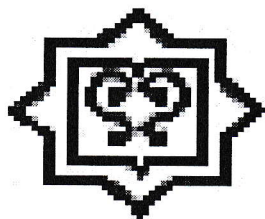
احمد ستوده



استادان راهنما:

دکتر میترا مهربانی

دکتر محمد حسن مصحفی



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Pharmacy

Herbal and Traditional Medicines Research Center

Pharm. D Thesis

Title:

Study of Antibacterial Effects of Different Fractions of corms of
Crocus sativus L.: Determination of MIC and Bioauthography

By:

Ahmad Sotudeh

Supervisors:

Dr. Mitra Mehrabani

Dr. Mohammad Hasan Moshafi

Year: 2017

Thesis No: 906

چکیده

مقدمه: با توجه به مسئله مقاومت روز افزون باکتری ها در مقابل داروهای ضد میکروبی شیمیایی و پدیده مقاومت باکتریایی، بشر همواره نیاز به کشف داروهای جدید به عنوان عوامل آنتی باکتریال دارد. در این مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی بنه زعفران که از قدیم الایام کلاله این گیاه به عنوان ادویه استفاده می گردیده، در برابر ۸ گونه میکروبی ذیل بررسی گردید.

۴ سویه گرم مثبت: استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سابتیلیس و میکروکوکوس لوتئوس. و ۴ سویه گرم منفی: اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و سراسیا مارسسنس.

روش کار: بنه زعفران در آبان ماه از منطقه خراسان رضوی جمع آوری شد، سپس توسط تکنیک ماسراسیون عصاره متانولی بنه گیاه بدست آمده و توسط تبخیر در خلا چرخان تغلیظ گردید و خشک شد و درصد عصاره خشک به وزن گیاه محاسبه گردید. خصوصیات فیتوشیمی بنه گیاه زعفران نیز بررسی گردید و میزان تام ترکیبات فنلی بر اساس استاندارد اسید گالیک و میزان تام ترکیبات فلاونوئیدی بر اساس استاندارد های روتین و کوئرستین سنجیده شد.

برای بررسی اثرات ضد میکروبی از دو روش آگار دایلوژن و بیو اتوگرافی به صورت مجزا استفاده شد. سپس از رقت های ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره گیاهی در متانول ۸۰ درجه برای بررسی اثرات ضد میکروبی و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) توسط روش آگار دایلوژن انجام پذیرفت.

در روش بیواتوگرافی فراکسیون های عصاره گیاهی به کمک حلال n-بوتانول، آب، تری فلورواستیک اسید (۰/۱:۱:۴) و با روش کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی شد. بعد از قرار دادن صفحات TLC در محیط کشت میکروبی و طی زمان انکوباسیون، لکه عدم رشد میکروبی به کمک معرف تترازولیوم نمایان شد و به صورت R_f بیان گردید.

نتایج: عصاره تام متانولی در روش آگار دایلوژن اثرات ضد باکتریایی بر روی سه میکروارگانیسم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سابتیلیس و میکروکوکوس لوتئوس در رقت ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر را نشان داد و حداقل غلظت مهار کنندگی معادل ۳۲ گزارش گردید و در تکنیک بیواتوگرافی که بر روی این سه گونه انجام پذیرفت در $R_f=0/12$ ناحیه عدم رشد کاملاً مشهود بود.

نتیجه گیری: در کل می توان گفت اثرات آنتی باکتریال در روش بیو تو گرافی بهتر قابل مشاهده است. در تعیین ترکیبات بنه گیاه مشخص گردید که گیاه دارای اجزای فنولی و فلاونویدی می باشد که اثرات ضد باکتریایی مشاهده شده نیز به همین اجزا نسبت داده می شود

کلید واژه: زعفران، بیواتوگرافی، آگار دایلوژن، خواص فیتو شیمیایی، حداقل غلظت مهار کنندگی

رشد

Abstract

Introduction: According to the bacterial resistance against the chemical drugs and worsening of this event, man always needs discover new drugs against microorganisms. In this study, the antibacterial activities of methanolic extract of corm of *Crocus sativus* L. (Iridaceae) that its stigma traditionally used as a spice, was investigated against: bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Micrococcus luteus*.

Method: Saffron corms were collected in November from Khorasan province. Then the methanolic extract of the corms was prepared by maceration method and after concentrating the extract, it was dried and percentage of extracts weight to the whole plant was estimated. The phytochemical characters also checked out and total phenolic and flavonoid contents of the extract were measured based on rutin (R) and quercetin (Q) and gallic acid (GA) equivalents respectively.

For studying the antibacterial effects the agar dilution and bioautography methods were used separately. Then the concentrations of 64, 32, 16, 8, 4, 2 mg/ml of extract in the methanolic solutions used to study antibacterial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of crude extract by using agar dilution method.

In bioautography method, the methanolic extract by concentration of 10 mg/ml was separated by n-Butanol: Trifluoroacetic acid: water (4: 0.1: 1) by thin layer chromatography method.

After placing TLC papers in culture medium with certain concentration of bacteria and incubating it, spot of inhibitory zone appeared by using tetrazolium salts and indicated as R_f .

Result: Methanolic extract in agar dilution method showed antibacterial effects on three bacteria strains: *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*.

Bioautography of methanolic extract showed antibacterial activity against

Staphylococcus epidermidis, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*

in $R_f = 0.12$.

Conclusion: In Bioautography method the antibacterial activity is better visible. After phytochemical properties examination the phenolic and flavonoid content were indicated, Supposed to be the antibacterial activity of corms of saffron is related to this component.

Keywords: saffron, Bioautography, agar dilution, Phytochemical properties, MIC